

## INFLUENCE DE LA SALINITÉ SUR LA MULTIPLICATION DU *SKELETONEMA COSTATUM* DANS LES EAUX ESTUARIENNES DE LA LOIRE<sup>1</sup>

Brigitte RAVAIL\* et Jean-Michel ROBERT\*

**RÉSUMÉ.** — L'étude de la fertilité potentielle d'eaux de l'estuaire de la Loire prélevées entre septembre 1981 et juillet 1982 a été estimée par la méthode des tests biologiques, en utilisant deux souches différentes du *Skeletonema costatum* (Gréville) Cleve. Les expériences conduites *in vitro* sur des eaux de salinités comprises entre 1 et 26 ‰ permettent de déterminer, pour cette espèce, un seuil halin d'environ 8 ‰ en deçà duquel, aucune croissance n'est observée, quelle que soit la souche. Cette méthode expérimentale réalisée sur des eaux naturelles, confirme le caractère euryhalin de cette diatomée, déjà mis en évidence chez d'autres clones. Des deux souches testées, celle isolée d'une zone proche de l'estuaire apparaît la moins sensible aux fluctuations de salinité. L'indice halin peut être considéré comme un élément primordial de la distribution du *S. costatum* dans l'estuaire de la Loire.

**ABSTRACT.** — The growth potential study of waters of the Loire estuary was estimated by means of algal bioassay method involving two strains of the Diatom *Skeletonema costatum*. The salinity of the samples collected from September 1981 to July 1982 ranged from 1 to 26 ‰. The results show the wide salinity tolerance of *S. costatum* : between about 7 ‰ and 26 ‰. They lead to define for the two strains a threshold limit of 8 ‰ under which no growth occurs and cells die. These findings realized on natural waters are in agreement with the results obtained with other clones of this diatom. The strain isolated from the brackish waters of a region located near the Loire estuary appears to be less sensitive to the fluctuations of salinity. Salinity is an environmental factor of overriding importance in distribution of *S. costatum* in the waters of the Loire estuary.

**MOTS CLÉS :** *Skeletonema costatum*, estuaire, salinité, test biologique.

### INTRODUCTION

L'estuaire de la Loire constitue une zone naturelle importante de mélange des eaux douces continentales et littorales marines du sud de la péninsule bre-

1. Communication présentée le 31 mai 1984 au Colloque de la Société Phycologique de France à Angers.

\* Équipe mixte CNRS - CNEXO, CREMA L'HOUMEAU, Institut des Sciences de la Nature, Laboratoire de Biologie marine, 2 rue de la Houssinière, 44072 Nantes Cedex, France.

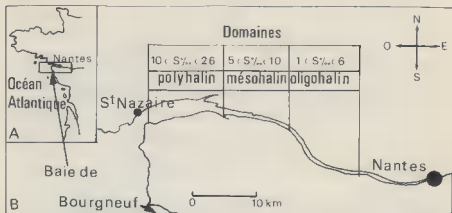


Fig. 1. — L'estuaire de la Loire : A, situation géographique ; B, domaines halins de l'estuaire interne entre Nantes et St-Nazaire.

tonne, puisque ce fleuve draine jusqu'à la mer les apports d'un bassin versant de 120 000 km<sup>2</sup>. La rencontre des eaux fluviales avec les eaux marines du flot entre les secteurs externe et interne de cet estuaire conduit à le subdiviser en trois domaines halins, selon un gradient de salinité de 0,5 ‰ près de Nantes jusqu'à 30 ‰ environ à St-Nazaire (Fig. 1).

La présente étude a pour but de préciser l'influence de la salinité sur la croissance et la multiplication de la diatomée marine planctonique *Skeletonema costatum* (Gréville) Cleve, introduite dans cet estuaire. Ce facteur de l'environnement est déjà connu comme étant prépondérant dans la distribution des diatomées marines dans les eaux estuariennes (DESIKACHARY et al., 1972), bien que certaines espèces soient réputées pour être très euryhalines (DROOP, 1958; QASIM et al., 1972). Toutefois, leur caractère euryhalin a été déterminé, soit à partir de l'analyse qualitative des peuplements algaux *in situ*, soit à partir de cultures réalisées sur des milieux synthétiques de salinités variées. Dans le cas précis de cette étude, nous avons choisi d'utiliser directement les eaux naturelles comme milieux d'incubation du *S. costatum*, par application de la méthode des tests biologiques tels qu'ils ont été pratiqués avec la même espèce dans l'étude de la fertilité des eaux des claires à huîtres de Vendée (ROBERT et al., 1979).

Deux souches de cette diatomée provenant de deux régions géographiquement éloignées ont donc été testées conjointement, sur des eaux de salinités comprises entre 1 et 26 ‰ : l'une isolée des claires ostréicoles situées au sud de l'estuaire de la Loire, sur le littoral de la baie de Bourgneuf (souche «Bouin»); l'autre provenant de l'algothèque de la Station marine d'Endoume à Marseille (souche «Marseille»). Les résultats obtenus avec ces deux souches nous ont conduit à définir plus précisément la limite inférieure de tolérance de cette espèce si commune dans les eaux côtières enclavées, vis-à-vis du facteur salinité.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

## A. — PRÉLEVEMENT ET SÉLECTION DES ÉCHANTILLONS

Parmi un lot d'eaux prélevées entre septembre 1981 et juillet 1982 dans le cadre d'un programme d'étude hydrobiologique de l'estuaire interne de la Loire, 22 échantillons sont sélectionnés pour constituer une gamme d'eaux de salinités comprises entre 1 et 26 ‰ (Fig. 2). Celles-ci avaient été immédiatement filtrées sur filtre Whatman GFC après leur prélèvement puis congelées et stockées à  $-25^{\circ}\text{C}$  dans des flacons en polyéthylène de 250 ml. Leurs salinités respectives avaient été préalablement relevées par la méthode réfractométrique de BENARD (1963).

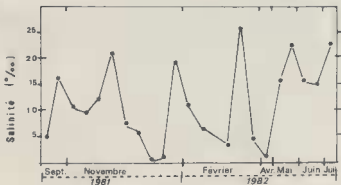


Fig. 2. — Salinité des échantillons d'eau prélevés, de septembre 1981 à juillet 1982, dans l'estuaire interne de la Loire, et servant aux tests.

## B. — PROTOCOLE DES TESTS BIOLOGIQUES

Les cellules des deux souches à tester de *S. costatum* sont prélevées sur des cultures en phase exponentielle de croissance, concentrées sur membranes puis lavées avec une eau de mer pauvre (eau méditerranéenne de surface de salinité 30 ‰), puis épuisées de leurs réserves cellulaires avant leur inoculation, par mise en culture sur cette même eau pendant 2 jours (ROBERT et al., 1979). Ces cellules-tests devant ensuite être inoculées sous un volume inférieur ou égal à 1 ml par échantillon d'eau, les densités numériques de chaque inoculum sont préalablement ajustées de manière à ce que la concentration initiale des cultures expérimentales soit de  $4,5 \cdot 10^6$  cellules.l<sup>-1</sup>.

Pour chaque souche, la série des 22 échantillons est décongelée à température ambiante puis 150 ml de chacun d'eux sont versés dans un erlenmeyer

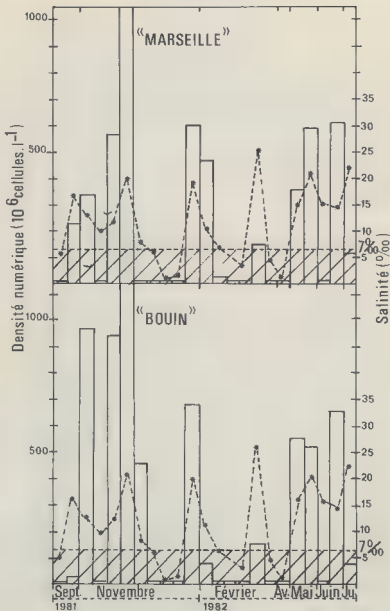


Fig. 3. — Biomasse produite par les souches «Bouin» et «Marseille» du *Skeletonema costatum*, cultivées sur les eaux estuariennes de la Loire de salinité comprise entre 1 ‰ et 26 ‰; la biomasse est estimée par la densité numérique en cellules; la zone hachurée correspond à la gamme de salinités pour lesquelles il y a absence totale de croissance des cellules-tests. Sept. : septembre; Av. : avril; Ju. : juillet.



stérile de 250 ml. La salinité des eaux est mesurée à nouveau après décongélation : les valeurs trouvées sont celles retenues pour l'analyse des résultats.

Les cellules-tests sont inoculées aseptiquement et les cultures expérimentales mises à incuber à 15°C sous un éclairage de 2000 lux à des alternances jour/nuit de 12 h/12 h. La croissance des cultures-tests est suivie par une estimation journalière de la densité numérique en algues, par comptage sur cellule hématimétrique de type Neubauer. L'incubation des cultures est arrêtée quand la quantité de cellules produites a atteint son maximum.

### RÉSULTATS (Fig. 3)

Quelle que soit la souche testée, il n'y a pas multiplication des cellules inoculées dans les eaux de salinité inférieure à environ 7 ‰. Il est toutefois à noter que dans le cas de la souche «Marseille», il se produit une légère croissance de la population à une salinité de 7,2 ‰, conduisant au bout de 10 jours d'incubation à une densité numérique maximale de  $11.10^6$  cellules.l<sup>-1</sup>, soit le double de la concentration initiale en cellules.

Dans les échantillons d'eau de salinité supérieure à 7 ‰, on observe le plus souvent une croissance des algues. Les densités numériques estimées pour une même eau sont alors globalement plus élevées avec la souche «Bouin» qu'avec la souche «Marseille» : elles sont comprises entre  $67.10^6$  et  $1\ 127.10^6$  cellules.l<sup>-1</sup> pour la première, entre  $100.10^6$  et  $1\ 051.10^6$  cellules.l<sup>-1</sup> pour la seconde. Dans l'eau de salinité égale à 21 ‰, la quantité de cellules produites est à son maximum dans les deux cas.

## DISCUSSION

### A. — IMPORTANCE DU FACTEUR SALINITÉ

La salinité apparaît donc comme l'élément primordial pouvant limiter la croissance de la multiplication du *S. costatum* lors du passage des eaux marines à des eaux plus saumâtres, dans l'estuaire interne de la Loire. Toutefois, cette influence ne peut être confirmée qu'après avoir vérifié si la richesse nutritive des eaux testées est suffisante pour permettre la croissance de cette Diatomée (Tableau 1).

Pour les 8 échantillons d'eau de salinité égale ou inférieure à 7 ‰, les quantités en éléments biogènes azote, phosphore et silicium, sont telles qu'elles ne peuvent pas limiter la croissance de l'algue. Cette salinité peut donc être considérée comme proche d'une valeur-seuil en deçà de laquelle les cellules ne peuvent pas se multiplier. Dans le cas de 5 échantillons d'eau de salinité supérieure à

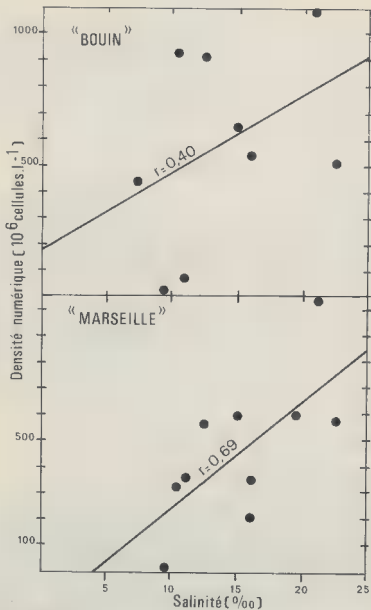


Fig. 4. — Diagrammes de dispersion de la densité numérique par rapport à la salinité pour les échantillons d'eau dont l'indice halin est supérieur à 7 ‰ et sur lesquels la croissance des cellules des souches « Bouin » et « Marseille » du *Skeletonema costatum* ne peut être limitée par les éléments biogènes azote, phosphore et silicium.

7 ‰, l'absence de croissance dans les cultures peut être en revanche expliquée par des teneurs faibles en azote et/ou en phosphore.

Référence	S ‰	$\Sigma N$ $\mu M$	P-PO <sub>4</sub> $\mu M$	Si-SiO <sub>3</sub> $\mu M$
< 7 ‰				
S1	5,0	149,1	1,48	62,8
N1	6,2	182,5	2,19	68,3
N2	1,0	236,5	3,05	130,0
N3	2,5	241,5	0,77	229,3
F1	7,0	72,3	1,03	146,3
F2	5,0	67,7	2,91	107,8
F3	2,0	178,5	0,95	120,2
F4	4,5	70,0	1,51	132,0
> 7 ‰				
S2	16,0	17,9	1,16	91,8
N4	9,5	180,0	0,52	91,5
F5	11,0	64,4	1,79	91,5
J1	15,5	16,0	1,06	19,0
J1 <sub>1</sub>	22,5	17,0	1,07	12,7

Tab. 1. — Teneurs en azote ( $\Sigma N = N-NH_4 + NO_2 + NO_3$ ), phosphore (P-PO<sub>4</sub>) et silicium (Si-SiO<sub>3</sub>) des eaux de salinité inférieure à 7 ‰ sur lesquelles la croissance des deux souches du *Skeletonema costatum* est nulle, ainsi que sur des eaux de salinité supérieure à 7 ‰ pour lesquelles la croissance observée est exceptionnellement faible, comparée à celle obtenue pour des eaux de salinités équivalentes.

Ne considérant donc que les échantillons d'eau de salinité comprise entre 9,5 et 22,5 ‰ et riches en éléments nutritifs, si on trace la diagramme de dispersion de la biomasse produite *in vitro* par rapport à l'indice halin de chaque type d'eau, on constate une relation directe entre biomasse et salinité, surtout pour la souche «Marseille» (Fig. 4). Cette dernière apparaît donc plus sensible aux variations halines que la souche «Bouin» isolée d'une aire proche de l'estuaire de la Loire. De plus, bien que le seuil de signification des coefficients de corrélation calculés soit faible, on peut noter que la plasticité de la souche «Bouin» vis-à-vis des salinités basses apparaît plus importante que celle observée pour la souche «Marseille» : l'ordonnée à l'origine de la droite de régression théorique est en effet de  $+175.10^6$  cellules.l<sup>-1</sup> pour la première et de  $-183.$

$10^6$  cellules.l<sup>-1</sup> pour la seconde (Fig. 4). Cette différence observée entre les deux souches peut s'interpréter par des différences génétiques liées au lieu d'isolement de chacune d'elles, ainsi qu'à des évolutions biochimiques consécutives à leur entretien, comme MURPHY (1978) l'a déjà noté sur 25 cultures clonales de cette même espèce.

## B. — SEUIL HALIN DE TOLÉRANCE

Quelle que soit la souche testée, la méthode utilisée permet de confirmer le caractère euryhalin de l'espèce *S. costatum*, comme l'ont déjà signalé DROOP (1958), CURL et MCLEOD (1961) et NAKANISHI et MONSI (1965). Toutefois, la valeur-seuil au-dessous de laquelle la multiplication des cellules-tests ne peut se faire, apparaît nettement supérieure à celle déterminée par d'autres auteurs (Tab. 2) : 7 ‰ environ, contre 2 ‰ pour PAASCHE (1975) et 5 ‰ pour CURL et MCLEOD (1961). QASIM et al. (1972) mentionnent la présence du *S. costatum* dans des eaux de salinité inférieure ou égale à 0,5 ‰. Toutefois, dans ce dernier cas, on ne peut pas préciser qu'il s'agit d'un seuil halin de tolérance étant donné que l'état physiologique des cellules n'a pas été testé. Dans le secteur oligohalin de l'estuaire de la Loire, nous avons nous-même observé l'apport abondant du *S. costatum* avec le flot, jusque dans des eaux de salinité 0,8 ‰ : nous ne pouvons pas pour autant en conclure la multiplication possible des cellules pour une telle salinité.

Gamme de salinité ‰ : optimum (opt) et/ou minimum (mini)	Provenance de la souche et/ou origine de l'eau testée	Auteurs
0 à 30 ‰	Cochin Backwater (Inde)	QASIM <u>et al.</u> (1972)
2 à 40 ‰ (mini : 2 ‰)	Fjord norvégien et Mer Baltique	PAASCHE (1975)
3,5 ‰ (mini)	Mer Baltique	LEVANDER (1947) <u>in</u> PAASCHE (1975)
5 à 45 ‰ (opt : 20 ‰)	Vineyard Sound (Etats-Unis)	CURL et Mc LEOD (1961)
18 ‰ (opt)	Tokyo Bay (Japon)	NAKANISHI et MONSI (1965)

Tab. 2. — Valeurs de la salinité pour lesquelles différents auteurs ont observé la présence ou la croissance du *Skeletonema costatum* dans différentes localités du monde.



La valeur élevée du seuil halin inférieur de tolérance obtenue par la méthode des tests biologiques, nous a amenés à nous interroger sur la méthodologie adoptée. Aussi, nous avons décidé de vérifier si la salinité de l'eau d'appauvrissement des cellules-tests pouvait influencer sur la croissance des cultures expérimentales conduites sur des eaux de salinités très différentes. Deux types d'appauvrissement sont donc réalisés : l'un à 30 ‰ et l'autre à 10 ‰, dans des conditions identiques à celles exposées précédemment. Les cellules de la souche « Bouin » sont ensuite inoculées selon le protocole déjà décrit, dans 4 échantillons d'eau de l'estuaire, choisis pour leurs concentrations en éléments nutritifs non limitantes et de salinité 4 ‰, 8 ‰, 11 ‰ et 25 ‰ (Tab. 3). Les résultats obtenus montrent tout d'abord qu'au-dessous d'une salinité de 8 ‰, la croissance des cellules-tests n'est pas possible, quelle que soit la souche. De plus, la biomasse maximale produite dans les cultures s'étant effectivement développées, atteint un niveau identique, quelle que soit la salinité de l'eau d'appauvrissement. En outre, la vitesse de croissance des cellules apparaît plus importante quand les cultures ont été incubées dans une eau à 25 ‰ que dans une eau à 11 ‰. De cette nouvelle série d'expériences, le caractère euryhalin de l'espèce est confirmé; celle-ci présente la faculté de s'adapter rapidement à de très brusques variations de salinité, qu'elles soit positives (de 10 ‰ à 25 ‰) ou négatives (de 30 ‰ à 11 ‰).

Echantillon	1 (S. = 4)		2 (S. = 8)		3 (S. = 11)		4 (S. = 25)	
	10 ‰	30 ‰	10 ‰	30 ‰	10 ‰	30 ‰	10 ‰	30 ‰
Salinité à l'appauvrissement								
Nombre de cellules produites ( $10^6 \cdot l^{-1}$ )	0,0	0,0	0,0	0,0	1 584,4	1 956,1	1 396,6	1 186,5
Durée (jours)	10	10	10	10	14	15	8	7

Tab. 3. — Biomasse produite par le *Skeletonema costatum* (souche « Bouin ») mis en culture dans quatre eaux de salinité croissante (eaux 1 à 4) après appauvrissement des cellules dans une eau de mer de Méditerranée, soit à une salinité de 10 ‰, soit de 30 ‰. La biomasse est estimée par la densité numérique en cellules.

## CONCLUSION

La méthode des tests biologiques, pratiquée sur des échantillons d'eaux naturelles de salinités variées, permet de confirmer le caractère euryhalin de l'espèce *S. costatum* : une croissance de l'algue est en effet observée entre 7 et 8 ‰ et 26 ‰. Elle permet en outre de définir, compte-tenu de la composition ionique de chaque eau, la limite haline au-dessous de laquelle la croissance des cellules n'est pas possible : 8 ‰ environ, valeur seuil identique quelle que soit la souche testée. L'analyse quantitative de cellules de cette diatomée, observée dans des

eaux estuariennes de salinité inférieure à la valeur seuil, devrait donc être complétée par l'analyse biochimique des populations afin de vérifier leur état physiologique. En effet, la présence du *S. costatum* dans une eau de salinité faible ne signifie pas pour autant qu'il puisse s'y multiplier.

La souche «Bouin» isolée d'une aire proche de l'estuaire de la Loire apparaît beaucoup plus indifférente aux variations de la salinité que la souche «Marseille» issue d'une zone géographique très éloignée. En conséquence, il serait préférable d'utiliser le *S. costatum* «Bouin» dans tout test biologique effectué sur les eaux marines et saumâtres du littoral ouest atlantique français, si cette espèce devait être retenue.

#### RÉFÉRENCES

- BENARD, L., 1963 - Détermination rapide de la salinité des milieux marins par réfractométrie. *Arch. Zool. exp. gén.* 102 : 7-13.
- CURL, H. Jr. et MCLEOD, G.C., 1961 - The physiological ecology of a marine Diatom, *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. mar. Res.* 19 : 70-88.
- DESIKACHARY, T.V. et RAO, V.N.R., 1972 - Salinity and Diatoms. *J. mar. biol. Ass. India* 14 : 524-538.
- DROOP, M.R., 1958 - Optimum relative and actual ionic concentrations for growth of some euryhaline algae. *Verh. internat. Ver. Limnol.* 13 : 722-730.
- MURPHY, L.S., 1978 - Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes. II. Loss of heterozygosity in clonal cultures of the Centric Diatoms *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycol.* 14 : 247-250.
- NAKANISHI, M. et MONSI, M., 1965 - Effect of variation in salinity on photosynthesis of phytoplankton growing in estuaries. *J. Fac. Sci. Tokyo Univ.* 9 : 19-42.
- PAASCHE, E., 1975 - The influence of salinity on the growth of some plankton diatoms from brackish water. *Norsk. J. Bot.* 22 : 209-215.
- QASIM, S.Z., BHATTATHIRI, P.M.A. et DEVASSY, V.P., 1972 - The influence of salinity on the rate of photosynthesis and abundance of some tropical phytoplankton. *Mar. Biol.* 12 : 200-206.
- ROBERT, J.M., MAESTRINI, S.Y., BAGES, M., DRENO, J.P. et GONZALES-RODRIGUEZ, E., 1979 - Estimation, au moyen de tests biologiques, de la fertilité pour trois diatomées des eaux des claires à huîtres de Vendée. *Oceanol. Acta* 3 : 275-286.